

氯沙坦联合小剂量叶酸对自发性高血压大鼠血液流变学和血管结构的影响

张秀华¹, 胡卢丰¹, 徐仁爱², 仝淑花², 徐雪姑², 江海燕² (1.温州医学院附属第一医院药剂科, 浙江 温州 325000; 2.温州医学院药学院, 浙江 温州 325035)

摘要: 目的 评价氯沙坦联合小剂量叶酸对自发性高血压大鼠(SHR)血液流变学和血管结构的影响。方法 30只12周龄SHR,随机分为3组($n=10$),空白对照组(SHR-C),氯沙坦组(SHR-L: $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),合用组(SHR-L+Y: 氯沙坦 $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ +叶酸 $0.4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),另选10只同龄Wistar大鼠作为正常对照组(WKY-C)。连续给药12周后,测定血液流变学指标,采用单因素方差分析,以LSD法进行组间比较。肠系膜血管组织切片用HE染色,主动脉测定血管壁厚度和管腔面积,计算厚度和管腔面积。结果 SHR-L+Y组与SHR-C相比,全血黏滞度各指标均下降, $P<0.05$; SHR-L+Y组与SHR-L相比,全血黏滞度无明显差别, $P>0.05$ 。血浆黏滞度,各组间差别不显著, $P>0.05$ 。血管组织学观察显示: SHR-L+Y组肠系膜动脉无增厚,内皮细胞层完整,内弹性膜结构清晰,主动脉中膜面积和管腔面积比与SHR-C组相比有统计学差异, $P<0.05$ 。结论 低剂量的氯沙坦和叶酸能有效的改善血液流变学,保护血管内皮,防止血管重构。

关键词: 氯沙坦; 叶酸; 自发性高血压大鼠; 血液流变学; 血管

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2010)11-1077-04

Effect of Losartan with Low Dose Folic Acid on Improving Hemorheology and Vascular Endothelium in Spontaneous Hypertensive Rats

ZHANG Xiuhua¹, HU Lufeng¹, XU Ren'ai², TONG Shuhua², XU Xuegu², JIANG Haiyan² (1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China; 2. School of Pharmacy, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the efficacy of losartan-Folic acid in hemorheology level and vascular endothelium. **METHODS** Thirty spontaneously hypertensive rats(SHR), aged 12 weeks, enrolled for a randomized controlled trial. Subjects were randomly assigned to the following three groups($n=10$): controlled group (SHR-C), losartan group(SHR-L: $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), losartan-Folic group (SHR-L+Y: losartan $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ +Folic acid $0.4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), another 10 of the same age Wistar Rats assigned for normal controlled group(WKY-C). Hemorheology was examined after oral administration for 12 weeks. The data was performed analysis of variance and LSD-t. Vessels of mesentery and aorta were stained by HE. The thickness and area of aorta was measured and analyzed by computer. **RESULTS** The viscosity of whole blood was decreased significantly in SHR-L+Y group compared with SHR-C, $P<0.05$. There are no obvious difference of hemorheology between SHR-L+Y group and SHR-L group, $P>0.05$. Effects on plasma viscosity was not significantly different among the four groups. For morphological remodeling in group SHR-L+Y, there are no thickness increased in mesenteric artery and endothelial wall is integrated, aortic tunica intima is smooth, the media cross-sectional area and vessel area of SHR-L+Y compared with group SHR-C was not significantly different, $P<0.05$. **CONCLUSION** Losartan-Folic acid could be used to decrease the viscosity, protect vascular endothelium and reversing vascular reconstruction.

KEY WORDS: losartan; Folic acid; spontaneously hypertensive rats; hemorheology; vascular

高血压是心血管疾病的常见病,持续高血压可使小动脉持久性收缩,损伤动脉内皮,导致动脉硬化引起各种心血管的并发症。近年的研究表明高血压与同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)间有高度相关性, Hcy 每增高约 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,收缩压和舒张压分别增长 0.5 和 0.7 mmHg^[1]。

叶酸是一种水溶性 B 族维生素,由喋呤、对

氨基苯甲酸和谷氨酸等三部分组成,与核苷酸的合成有密切关系,可影响造血细胞功能,叶酸缺乏可引起巨细胞贫血。近年的研究显示,叶酸在心血管疾病中有重要作用,它与 Hcy 的代谢紧密相关,能改善高血压患者心脏和血管的交感神经压力感受器的敏感性,改善迷走神经和压力感受器的调节功能^[2]。临床研究显示,长期口服叶酸,

作者简介: 张秀华,女,硕士,主任药师

Tel: (0577)88069558

E-mail: wzzhangxiuhua@126.com

能控制血浆 Hcy 的水平,改善动脉内皮的功能,可预防高半胱氨酸血症患者发生动脉粥样硬化^[3]。叶酸还能有效地降低妊高症的风险^[4]。因而高血压患者补充小剂量的叶酸对控制血 Hcy 和改善动脉内皮功能而言都是有效的。

高血压患者多有血液黏滞度升高,红细胞硬化聚集^[5]。目前有关叶酸对高血压血液流变学的研究报道很少,本实验旨在考察氯沙坦联合小剂量叶酸对血液流变学的影响,依据文献报道^[6],设置氯沙坦-叶酸的剂量为 25 mg:0.4 mg,并考察对血管结构的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试药与动物 氯沙坦购自杭州默沙东制药有限公司,批号:09080,规格:每片 100 mg。叶酸片购自天津飞鹰制药有限公司,批号:0903003,规格:每片 5 mg。自发性高血压大鼠(Spontaneously hypertensive rats, SHR),♂,30 只,12 周龄,体重 250~350 g,同源正常血压 Wistar-Kyoto 大鼠(Wistar-Kyoto rats, WKY),♂,10 只,体重 270~350 g,均购自中科院上海实验动物中心,动物合格证号:SCXK(沪)2007-0005。

1.1.2 仪器 普及型便携式电子秤,PL-S 系列,梅特勒-托利多上海仪器公司。高速低温离心机(TGL-16G),上海安亭科学仪器厂。全自动锥板式血流变仪(KES-900),徐州百维医用科技发展有限公司。徕卡 DM 2500 高清晰度显微镜,德国美康 HM550。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及给药 将 12 周龄 SHR(SPF 级)随机分成空白对照组(SHR-C)、氯沙坦组(SHR-L)和合用组(SHR-L+Y),每组 10 只。3 组间性别、体重、血压无差别,血压正常的 Wistar-Kyoto 大鼠(SPF 级)设为(WKY-C)组,共 10 只。4 组大鼠均采用灌胃给药,给药剂量:SHR-L 组给以氯沙坦 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹,SHR-L+Y 组给以氯沙坦叶酸的混合制剂(25:0.4) mg·kg⁻¹·d⁻¹,SHR-C 和 WKY-C 组给以生理盐水。大鼠 3~4 只一笼,光照控制保证 12 h 明、暗条件,环境安静,以标准饲料及净化水喂养,每日上午 8 时用灌胃器给药,每隔 10 d,用电子秤测定大鼠体重,依据体重调整给药量,连续灌胃 12 周。

1.2.2 血液流变学检测 给药 12 周后,大鼠称重,腹腔注射 10%水合氯醛 3 mL·kg⁻¹麻醉,迅速打开胸腔,右心室穿刺采血 4 mL,注入含有肝素钠 80 IU 的 5 mL 试管中,用血液流变仪检测全血黏度(低切、中切、高切),血浆黏度等血液流变学指标。所有标本在抽血后 1~3 h 内完成检测。

1.2.3 血管形态学与组织学研究 心脏取血后的大鼠,立即分离取出胸主动脉和肠系膜三级血管,用 4%的甲醛固定后,石蜡包埋切片,切片厚度 5 μm。组织切片经 HE 染色后,用徕卡 DM 2500 高清晰度显微镜观察,DFC420 数字彩色图像照相机获取图像,并用图像软件分析系统分析,观察肠系膜动脉组织学改变;主动脉取起始段约 0.3 cm 做石蜡包埋切片,测量中膜厚度,管腔内径,计算中膜面积和管腔面积及比值。

1.3 统计学分析

血液流变学数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,选用单因素方差分析,依据方差分析的结果,采用 LSD-t 法对 4 组间数据进行两两比较。

2 结果

2.1 血液流变学的改变

4 组大鼠血液流变学指标:全血低切黏度,中切黏度,高切黏度,血浆黏度的均数值见表 1。各项血液流变学指标(低切黏度,中切黏度 1,中切黏度 2,高切黏度,血浆黏度)经 Levene 法进行方差齐性检验, P 值均>0.1。全血黏度(高切、中切、低切)经 ANOVA 法检测, P 值均<0.05,各组间差异显著,以 LSD 法进行组间两两比较。SHR-L+Y 组与 SHR-C 相比,全血高切黏度、中切黏度、低切黏度有差别 $P<0.05$,血浆黏度无明显差别;SHR-L 与 WKY-C 相比,全血黏度和血浆黏度的差别无统计学意义, $P>0.05$ 。SHR-L 与 SHR-C 相比,虽然全血黏度的均数有下降,但是 $P>0.05$,结果见表 1。

2.2 肠系膜动脉组织学改变

高血压病病程长,起始发病主要累及 1 mm 及 1 mm 以下的细小阻力型动脉。图 1 可见 SHR-C 组肠系膜动脉内皮细胞层不完整,内弹性膜结构不清,中膜平滑肌层细胞排列紊乱;SHR-L+Y 组可见内皮细胞层完整,内弹性膜结构清晰,中膜平滑肌层细胞排列规则;SHR-L 动脉内膜内皮细胞层结构欠完整,内弹性膜结构清晰。

表 1 4 组大鼠血液流变学指标($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Hemorheology of rat in four groups ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	全血低切率/mpas	全血中切率 1/mpas	全血中切率 2/mpas	全血高切率/mpas	血浆黏度/mpas
SHR-C	28.83±2.71	6.79±0.27	12.25±0.81	4.96±0.14	1.35±0.14 ⁴⁾
SHR-L+Y	23.08±3.35 ¹⁾²⁾	5.82±0.60 ¹⁾²⁾	10.18±1.22 ¹⁾²⁾	4.37±0.34 ¹⁾²⁾	1.34±0.16 ⁴⁾
SHR-L	25.96±3.94 ³⁾	6.37±0.76 ³⁾	11.26±1.52 ³⁾	4.72±0.51 ³⁾	1.29±0.23 ⁴⁾
WKY-C	23.31±5.89	5.74±1.13	10.13±2.26	4.26±0.77	1.24±0.19 ⁴⁾

注: SHR-L+Y 与SHR-C相比, ¹⁾ $P<0.05$; SHR-L+Y与SHR-L相比, ²⁾ $P>0.05$; SHR-L 与SHR-C相比, ³⁾ $P>0.05$, ⁴⁾ $P>0.05$

Note: SHR-L+Y compare with SHR-C, ¹⁾ $P<0.05$; SHR-L+Y compare with SHR-L, ²⁾ $P>0.05$; SHR-L compare with SHR-C, ³⁾ $P>0.05$, ⁴⁾ $P>0.05$

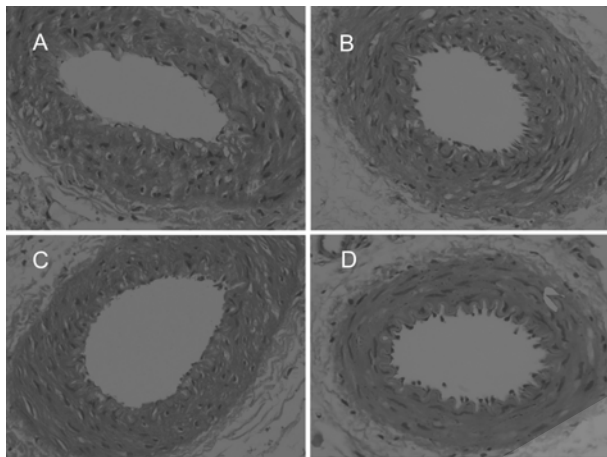


图 1 肠系膜动脉横断面(×400)

A-SHR-C; B-SHR-L+Y; C-SHR-L; D-WKY-C

Fig 1 Morphology of mesenteric artery(×400)

A-SHR-C; B-SHR-L+Y; C-SHR-L; D-WKY-C

2.3 主动脉血管改变

2.3.1 主动脉形态学改变 持续高血压可损伤大中动脉, 并发动脉粥样硬化。图 2 可见 SHR-C 组主动脉中膜增厚, 血管内膜不光整, 内膜表面毛糙, SHR-L+Y 组可见内膜光整, SHR-L 组中膜较 SHR-C 组薄, 但是内膜表面与其相似, 表面不光整。

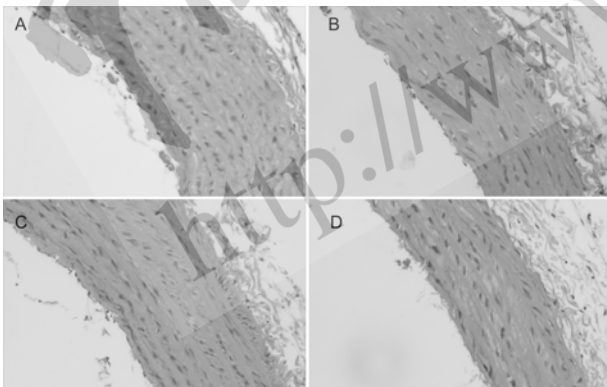


图 2 主动脉横断面(×200)

A-SHR-C; B-SHR-L+Y; C-SHR-L; D-WKY-C

Fig 2 Morphology of aorta(×200)

A-SHR-C; B-SHR-L+Y; C-SHR-L; D-WKY-C

2.3.2 主动脉中膜面积与管腔面积的比值 高血压引起的血管结构改变, 主要特征为血管壁与管

腔的比值增大。各组主动脉中膜厚度(MT)、血管标准化内径(LD)(长径和短径的平均值)及中膜面积(MA)与血管内面积(LA)比值的结果见表 2。组间 LSD 检验显示, SHR-C 组和 SHR-L+Y、SHR-L 组间比较 $P<0.01$, SHR-L+Y 组和 SHR-L 组间比较 $P>0.05$ 。

表 2 氯沙坦对主动脉重塑的形态学影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effect of losartan on the morphological parameters of aorta remodeling($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	主动脉中膜厚度/ μm	血管标准化内径/ μm	中膜面积与血管内面积比/%
SHR-C	184.12±3.20	1 764.01±59.31	21.99±.99
SHR-L+Y	169.38±8.83	1 869.13±37.39	18.95±1.11 ¹⁾²⁾
SHR-L	163.55±7.14	1 856.20±97.71	18.43±1.17 ¹⁾
WKY-C	155.13±9.05	1 868.39±85.01	17.30±.82

注: SHR-C 与 SHR-L+Y 和 SHR-L 相比, ¹⁾ $P<0.01$; SHR-L+Y 与 SHR-L 相比, ²⁾ $P>0.05$

Note: SHR-C compare with SHR-L+Y or SHR-L, ¹⁾ $P<0.01$; SHR-L+Y compare with SHR-L, ²⁾ $P>0.05$

3 讨论

血压升高不仅与心输出量和血管阻力有关, 而且还与血液黏度有关。氯沙坦是血管紧张素 II₁ 型受体(AT₁R)的拮抗剂, 研究表明, 氯沙坦还能降低全血黏度、血浆黏度、红细胞聚集指数等^[7]。老年高血压患者口服氯沙坦治疗 12~17 个月后, 全血低切黏度、血浆黏度、红细胞聚集指数和红细胞电泳指数可明显下降^[8]。本实验中 SHR-L 组和 SHR-C 组相比, 全血黏滞度的均值有下降, 但是 $P>0.05$, 可能与氯沙坦的给药时间过短有关。

本实验结果显示, 低剂量的氯沙坦联用叶酸后能明显的改善全血黏度, 与 SHR-C 组相比 $P<0.05$; 与高剂量的氯沙坦组相比, 全血黏度均值下降更明显, 提示疗效更显著。产生这种差异的原因, 可能与叶酸有关。叶酸能降低血半胱氨酸, 还可降低总胆固醇、LDL 胆固醇、甘油三酯^[9], 但具体的影响机制还有待进一步研究。

高血压时血管内皮功能的损伤严重, 氯沙坦

能防止主动脉肥厚,改善血管内皮功能^[10-11]。但是ACE-抑制剂对血高半胱氨酸无影响^[12],不能逆转血中Hcy水平升高对血管内皮造成的直接或间接损伤。高Hcy可减少血管内皮细胞一氧化氮(NO)的合成与释放,导致内皮损害,同时Hcy还可增加氧化应激,刺激血管平滑肌增殖,改变血管的弹性,影响血管舒缩调节功能^[13]。本研究显示加用小剂量叶酸后对血管内皮的保护要比单用高氯沙坦的效果好,主动脉和肠系膜动脉的组织形态学观察显示,SHR-L+Y组的动脉内膜更完整,内皮细胞与内弹性膜清晰可见。

主动脉属于大动脉,内弹性膜由几层弹性膜组成,与中膜中的弹性膜相连,两者没有明确的分界。主动脉经HE染色后,内弹性膜与中膜难以区分,但是中膜与外膜可明显区分,因而实验中实际测量的厚度是内弹性膜和中膜的厚度。评价血管重构的方法有采用中膜厚度/管腔半径的比值^[11],也有采用中膜面积/管腔面积的比值,采用面积比能消除血管内径不一致的误差。主动脉血管在病理切片上,并不呈现规则的圆形,内径并不完全一致,应多点测量取平均值,作为标准化的血管内径来计算血管的面积。本实验采用面积比值,结果显示低剂量的氯沙坦和叶酸与高剂量的氯沙坦在中膜面积/管腔面积的比值上结果相近 $P>0.05$;两组与SHR组相比,其比值均下降, $P<0.01$,提示高剂量的氯沙坦和低剂量的氯沙坦均能逆转血管重构。

综上所述,低剂量的氯沙坦和叶酸能有效地改善血液流变学,保护血管内皮,防止血管重构。与高剂量的SHR-L组相比,SHR-L+Y组在降低全血黏滞度和保护血管内皮上,疗效更显著。

REFERENCES

- [1] LIM U, CASSANO P A. Homocysteine and blood pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994[J]. *Am J Epidemiol*, 2002, 156(12): 1105-1113.
- [2] BECHIR M, ENSELEIT F, CHENEVAR D, et al. Folic Acid improves baroreceptor sensitivity in hypertension[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2005, 45(1): 44-48.
- [3] WOO K S, CHOOK P, CHAN L L, et al. Long-term improvement in homocysteine levels and arterial endothelial function after 1-year folic acid supplementation[J]. *Am J Med*, 2002, 112(7): 535-539.
- [4] HERNANDEZ D S, WERLER M M, LOUIK C, et al. Risk of gestational hypertension in relation to folic acid supplementation during pregnancy[J]. *Am J Epidemiol*, 2002, 156(9): 806-812.
- [5] PIRRELLI A. Arterial hypertension and hemorheology. What is the relationship?[J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 1999, 21(3-4): 157-160.
- [6] LI J P, HUO Y, LIU P, et al. Efficacy and safety of Enalapril-Folate acid tablets in lowering blood pressure and plasma homocysteine[J]. *J Peking Univ (北京大学学报)*, 2007, 39(6): 614-618.
- [7] MA B X, WU S S, QI L, et al. Effects of losartan for hemarheology and kidney of older hyperpietic patient [J]. *Chin J Hypertension(中华高血压杂志)*, 2007, 15(1): 70-71.
- [8] WANG A L, LIU Z T, YUAN B S. clinical observation of hemarheology effect of losartan for older hyperpietic patient [J]. *Chin J Synthetical Med (中华综合医学杂志)*, 2004, 6(5): 19-20.
- [9] MCGREGOR D, SHAND B, LYNN K, et al. A controlled trial of the effect of folate supplements on homocysteine, lipids and hemorheology in end-stage renal disease[J]. *Nephron*, 2000, 85(3): 215-220.
- [10] ZHANG C J, WANG M, BAI D. Effect of losartan on reversing cardiovascular hypertrophy in spontaneous hypertensive rats. [J]. *Chin New Drugs J(中国新药杂志)*, 2003, 12(1): 32-34.
- [11] CERAVOLO R, MAIO R, PUJIA A, et al. Pulse pressure and endothelial dysfunction in never-treated hypertensive patients [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41(10): 1753-1758.
- [12] DIERKES J, LULEY C, WESTPHAL S, et al. Effect of lipid-lowering and anti-hypertensive drugs on plasma homocysteine levels [J]. *Vasc Health Risk Manag*, 2007, 3(1): 99-108.
- [13] RODRIGO R, PASSALACQUA W, ARAYA J, et al. Homocysteine and essential hypertension[J]. *J Clin Pharmacol*, 2003, 43(12): 1299-1306.